

PCT/KR 03/02927

RO/KR 31.12.2003



별첨 사본은 아래 출원의 원본과 동일함을 증명함.

This is to certify that the following application annexed hereto
is a true copy from the records of the Korean Intellectual
Property Office.

출원 번호 : 10-2003-0048625
Application Number

출원 년 월 일 : 2003년 07월 16일
Date of Application JUL 16, 2003

출원인 : 한국생명공학연구원 외 1명
Applicant(s) Korea Research Institute of Bioscience and Biot

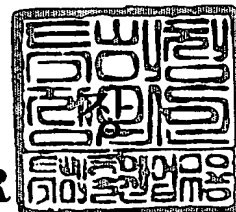
**PRIORITY
DOCUMENT**
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)



2003 년 12 월 31 일

특 허 청

COMMISSIONER



【서지사항】

【서류명】	출원인 변경 신고서
【수신처】	특허청장
【제출일자】	2003. 12. 30
【구명의인(양도인)】	
【명칭】	(주)바이오리더스
【출원인코드】	1-2000-026462-9
【사건과의 관계】	출원인
【신명의인(양수인)】	
【명칭】	한국생명공학연구원
【출원인코드】	3-1999-034166-5
【대리인】	
【성명】	이처영
【대리인코드】	9-2003-000118-9
【포괄위임등록번호】	2003-021868-5
【포괄위임등록번호】	2003-020869-0
【사건의 표시】	
【출원번호】	10-2003-0048625
【출원일자】	2003.07.16
【심사청구일자】	2003.07.16
【발명의 명칭】	티벡터와 발현벡터로의 기능을 동시에 가지는 플라스미드 및 이를 이용한 목적유전자의 발현
【변경원인】	일부양도
【취지】	특허법 제38조제4항·실용신안법 제20조·의장법 제24조 및 상표법 제12조 제1항의 규정에 의하여 위와 같이 신고합니다. 대리인 이처영 (인)
【수수료】	13,000 원
【첨부서류】	1. 기타첨부서류[양도증, 인감증명서]_1통

【서지사항】

【서류명】 특허출원서
【권리구분】 특허
【수신처】 특허청장
【제출일자】 2003.07.16
【발명의 명칭】 티벡터와 발현벡터로의 기능을 동시에 가지는 플라스미드 및 이를 이용한 목적유전자의 발현
【발명의 영문명칭】 Plasmid having a function of T-vector and expression vector, and expression of the target gene using the same
【출원인】
【명칭】 (주)바이오리더스
【출원인코드】 1-2000-026462-9
【대리인】
【성명】 이처영
【대리인코드】 9-2003-000118-9
【포괄위임등록번호】 2003-021868-5
【발명자】
【성명의 국문표기】 성문희
【성명의 영문표기】 SUNG, MOON HEE
【주민등록번호】 570603-1024010
【우편번호】 305-308
【주소】 대전광역시 유성구 장대동 325-6 야베스빌라 302호
【국적】 KR
【발명자】
【성명의 국문표기】 홍승표
【성명의 영문표기】 HONG, SEUNG PYO
【주민등록번호】 650826-1019514
【우편번호】 305-751
【주소】 대전광역시 유성구 송강동 송강그린아파트 310-1503
【국적】 KR
【발명자】
【성명의 국문표기】 최윤호
【성명의 영문표기】 CHOI, YOON HO
【주민등록번호】 670205-1025528

【우편번호】	301-212
【주소】	대전광역시 중구 사정동 433-68 공원맨션 나동 301호
【국적】	KR
【발명자】	
【성명의 국문표기】	김광
【성명의 영문표기】	KIM,KWANG
【주민등록번호】	680225-1823017
【우편번호】	305-720
【주소】	대전광역시 유성구 신성동 대림두레아파트 103-506
【국적】	KR
【발명자】	
【성명의 국문표기】	이일한
【성명의 영문표기】	LEE, IL HAN
【주민등록번호】	740121-1702811
【우편번호】	412-020
【주소】	경기도 고양시 덕양구 성사동 신원당 아파트 802-1504
【국적】	KR
【발명자】	
【성명의 국문표기】	박제현
【성명의 영문표기】	PARK, JE HYEON
【주민등록번호】	750919-1820618
【우편번호】	305-804
【주소】	대전광역시 유성구 신성동 147-1 아트빌 301호
【국적】	KR
【발명자】	
【성명의 국문표기】	송영신
【성명의 영문표기】	SONG,YOUNG SHIN
【주민등록번호】	780328-2449113
【우편번호】	300-831
【주소】	대전광역시 동구 자양동 196-13
【국적】	KR
【심사청구】	청구

【핵산염기 및 아미노산 서열목록】

【핵산염기 및 아미노산 서열목록】**【서열개수】** 7**【서열목록의 전자파일】** 첨부**【취지】**

특허법 제42조의 규정에 의한 출원, 특허법 제60조의 규정에 의한 출원심사를 청구합니다. 대리인
이처영 (인)

【수수료】**【기본출원료】** 20 면 29,000 원**【가산출원료】** 11 면 11,000 원**【우선권주장료】** 0 건 0 원**【심사청구료】** 15 항 589,000 원**【합계】** 629,000 원**【감면사유】** 소기업 (70%감면)**【감면후 수수료】** 188,700 원**【첨부서류】**

1. 요약서·명세서(도면)_1통 2. 기타첨부서류_1통

【요약서】**【요약】**

본 발명은 항시적 고발현 벡터(pHCE DNA vector)로부터 유래된 HCE 프로모터에 티벡터로
의 기능을 부여하여 간단하고 신속하게 목적단백질을 발현시킬 수 있는 티벡터와 발현벡터로의
기능을 동시에 가지는 플라스미드(pHCE-FOREX), 상기 플라스미드에 목적유전자가 삽입되어 있
는 발현벡터 및 이를 이용한 목적유전자의 발현에 관한 것이다.

본 발명에 따른 플라스미드는 단 한번의 티벡터 클로닝 과정만으로 간단하고 신속하게
목적단백질을 발현하는 벡터로 전환이 가능하고, 상기 발현벡터로 전환된 플라스미드는 재 형
질전환 단계가 필요치 않으며, 고가의 유도물질 첨가 없이 재조합 대장균의 배양만으로 목적단
백질의 고발현이 가능하다. 따라서, 다량의 목적 유전자들에 대한 발현 플라스미드의 동시 제
조가 가능하여, 특정 미생물 유전체의 발현시스템 구축 및 특정 유전자군의 발현시스템 구축에
매우 효율적일 것으로 기대된다.

【대표도】

도 1

【색인어】

티벡터, 형질전환, 플라스미드, 목적단백질, 발현

【명세서】

【발명의 명칭】

티벡터와 발현벡터로의 기능을 동시에 가지는 플라스미드 및 이를 이용한 목적유전자의 발현 {Plasmid having a function of T-vector and expression vector, and expression of the target gene using the same}

【도면의 간단한 설명】

도 1은 신규 고발현 티벡터(pHCE-FOREX-T)의 개략도이다.

도 2는 대장균 JM109로부터 분리한 본 발명의 고발현 티벡터용 플라스미드 (pHCE-FOREX)를 *AspEI*으로 절단하였을 때 잘려져 나온 DNA 단편이 전개된 아가로스 젤 전기영동 사진이다.

도 3은 PCR에 의해 증폭된 hTNF- α 의 아가로스 젤 전기영동 사진이다.

도 4는 본 발명의 고발현 티벡터를 이용한 클로닝을 확인하기 위해 무작위적으로 선별된 12개의 콜로니를 *NdeI* 제한효소로 절단한 후 나온 DNA 절편을 전기영동한 아가로스 젤 사진이다.

도 5는 클로닝 확인을 위해 선별되었던 12개의 형질전환체로부터 얻은 단백질을 전기영동한 SDS-폴리아크릴아마이드 젤(SDS-PAGE) 사진이다.

【발명의 상세한 설명】**【발명의 목적】****【발명이 속하는 기술분야 및 그 분야의 종래기술】****<6> 발명의 분야**

<7> 본 발명은 티벡터와 발현벡터로의 기능을 동시에 가지는 플라스미드, 상기 플라스미드에 목적유전자가 삽입되어 있는 발현벡터 및 이를 이용한 목적유전자의 발현에 관한 것이다.

<8> 발명의 배경

<9> 목적하는 유전자를 벡터에 삽입하여 발현시키는 대표적인 방법으로 중합효소연쇄반응 (polymerase chain reaction: PCR)을 이용하여 목적유전자를 증폭시킨 후 발현벡터에 삽입하는 방법이 있다. 이 PCR로 생성된 유전자 증폭산물은 반응에 이용하는 Taq DNA 중합효소 (polymerase)의 말단전이효소(terminal transferase) 활성으로 인해 3'-말단에 아데닌 염기를 갖는 뉴클레오티드가 하나 더 추가된 상태로 얻어진다(Clark, J.M., Nucleic Acid Res., 16:9677, 1988).

<10> 전기한 유전자 증폭산물의 특이적인 특성으로 인하여 목적유전자의 증폭산물은 제한효소 처리나 말단 변이효소 처리를 통해 평활말단(blunt end) 이나 점착 말단(cohesive end)을 갖도록 만드는 과정을 거친 후 플라스미드 벡터에 클로닝 해야 하며, 이는 여러 단계를 거치며, 효율이 떨어지고 어렵다는 단점이 있다.

- <11> 이러한 문제점을 극복하기 위해, 양끝의 3'-말단에 티민 염기를 갖는 뉴클레오티드가 하나 더 추가되어있는 선형의 벡터인 티벡터는 PCR로 증폭된 유전자 산물을 쉽게 클로닝하기 위하여 구상되어 제조된 벡터이다.
- <12> 티벡터를 제조하는 방법으로는 첫 번째, 인위적으로 3'-말단에 티민 염기를 갖는 뉴클레오티드를 추가시키는 방법이 있다. 클로닝 벡터를 평활말단으로 만들 수 있는 제한효소를 사용하여 절단하고, 이 평활말단의 선형 벡터에 Taq DNA 중합효소(Marchunk, D. *et al.*, Nucleic Acid Res. 19:1154, 1991)를 이용해 디옥시티미딘 트리포스페이트(deoxythymidine triphosphate, dTTP)를 첨가하거나, 말단 디옥시뉴클레오티드 전이효소(terminal deoxynucleotidyl transferase)를 이용하여(Holton, T.A. *et al.*, Nucleic Acid Res., 19:1156, 1991) 디디옥시티미딘 트리포스페이트(dideoxythymidine triphosphate, ddTTP)를 첨가함으로써 3'-말단에 티민 염기를 갖는 뉴클레오티드가 추가된 선형의 티벡터를 제조할 수 있다.
- <13> 그러나 이 방법에서는 말단 전이효소의 활성효율에 의존적으로 티벡터가 제조되므로, 최적 반응조건이 갖추어지지 않거나 비활성화된 효소들로 인하여 티미딘 뉴클레오티드가 추가되지 않은 불완전한 티벡터가 제조될 수 있다. 이로 인해 클로닝 과정에서 유전자 증폭산물이 클로닝 되지 않은, 자가결합(self-ligation) 산물의 빈도가 높아질 수 있으며, 이 산물이 대장균에 형질전환 되어 높은 비율로 발견되는, 따라서 유전자 증폭 산물의 클로닝 효율이 저하되는 단점이 있다.
- <14> 티벡터를 제조하는 두 번째 방법은 제한효소 중 유전자를 절단하였을 때 유전자의 3'-말단에 티민 염기를 갖는 뉴클레오티드 한 개만을 남길 수 있는 제한효소인 *AspEI*(Yoshikazu,

I. *et al.*, Gene, 130:152, 1993), *HphI*(David A.M. *et al.*, Bio/Technology, 9:65, 1991), II 또는 *XcmI* 등을 이용하는 방법이다.

- <15> 이 방법은 사용될 제한효소의 인식부위 2개를 나란히 배열하고 제한효소로 절단하였을 때, 절단된 벡터의 3'-말단에 티미딘 뉴클레오티드 하나씩 만을 남기도록 디자인 한 올리고뉴클레오티드를 합성하여 모벡터에 클로닝한 후, 전기 제한효소로 절단하여 티벡터를 제조하는 것으로 모벡터에 제한효소 인식부위가 존재할 때는 사용할 수 없다는 단점이 있다.
- <16> 모벡터로 많이 사용되는 pUC19를 기준으로 분석해 볼 때, 사용 가능한 제한효소 중 *HphI* 및 *MboI*는 각각 7곳에 전기 효소의 인식부위가 존재하고, *AspEI*의 경우는 1곳이 존재하며, 단지 *XcmI*만이 인식부위가 존재하지 않으므로, *XcmI*을 이용한 티벡터 개발에 많은 연구가 집중되고 있다(Kovalic, D. *et al.*, Nucleic Acid Res., 19:4560, 1991; Cha. J. *et al.*, Gene, 136:369, 1993; Testoris, A. *et al.*, Gene, 143:151, 1994; Harrison, J. *et al.*, Anal. Biochem., 216:235, 1994; Boroskov, A.Y. *et al.*, Biotechniques, 22:812, 1997).
- <17> 그러나 이 경우에도, 티벡터를 제조하기 위하여 제한효소로 절단하였을 때 유리되는 유전자 단편이 너무 작아, 아가로스 젤 전기영동 상에서 불완전하게 절단된 벡터와 완전하게 절단된 벡터의 이동거리 차가 작은 문제점이 있다.
- <18> 따라서, 젤 추출법으로 완전하게 절단된 티벡터를 순수 분리하고자 해도 불완전하게 절단된 벡터가 혼재하게 된다. 그 결과, 제한효소에 의하여 불완전하게 절단된 일부 벡터가 그대로 유전자 증폭산물을 클로닝 하는데 이용되어, 자가결합 된 벡터가 형질전환된 대장균에서 높은 비율로 발견되고 이로 인한 유전자 증폭산물의 클로닝 효율이 감소하는 단점을 내포하고 있다.

- 19> 이러한 단점을 극복하기 위하여, 아가로스 젤 전기영동 상에서 절단되어 분리되는 유전자 단편을 뚜렷하게 식별하고, 불완전한 벡터가 제조되어 자가결합으로 유전자 증폭산물이 클로닝 되지 않은 벡터만 형질전환되는 문제점을 해결하여, 형질전환 시에 자가결합 된 벡터가 발견되는 비율을 낮춤으로 유전자 증폭산물의 클로닝 효율을 증가시킬 수 있는 티벡터를 제조하는 기술을 개발하려는 노력이 계속되어 왔다.
- 20> 한편, 목적 단백질을 대량발현하기 위한 일반적인 실험에서는 일차적으로 발현시스템에 적합한 발현용 플라스미드의 구축단계가 선행된다. 발현용 플라스미드 구축시, 벡터에 삽입될 목적 단백질의 유전자를 증폭할 때 사용하는 올리고뉴클레오티드는 증폭산물을 발현벡터에 쉽게 클로닝하기 위하여 목적단백질을 암호화하는 유전자의 염기서열을 조사한 후, 목적유전자의 염기서열에 존재하지 않는 제한효소 인식부위를 삽입하여 제조하게 된다.
- 21> 그 결과, 상기 제조한 올리고뉴클레오티드에는 주형으로 사용되는 목적유전자의 염기서열 이외에 제한효소 인식부위를 첨가하기 위한 여분의 뉴클레오티드가 추가되기 때문에, 이를 이용하여 PCR로 목적 유전자를 증폭할 때 올리고뉴클레오티드가 주형유전자에 특이적으로 어닐링(annealing) 되는 효율이 낮아져 목적유전자만을 선택적으로 증폭시키기 어려운 단점이 있다.
- 22> 또한, 클로닝의 편의성을 위해서 유전자 증폭에 사용되는 올리고뉴클레오티드에 삽입한 제한효소 인식 부위는 목적유전자의 증폭산물의 양 말단에 위치하기 때문에 절단되는 효율이 낮은 단점이 있다.
- 23> 따라서, 증폭된 목적 유전자 산물을 티벡터에 클로닝 하여 목적 유전자가 함유된 티벡터 클론을 선별한 후, 이를 제한효소로 절단하여 최종 발현 플라스미드 구축을 위해 사용함으로써

목적단백질의 발현용 플라스미드 구축을 위한 효율을 높이고 있으나, 이 방법은 두 단계의 과정을 거쳐야 하는 불편함을 가지고 있다.

<24> 목적 단백질 대량발현의 경우, 그 목적의 많은 부분이 보다 간편하고 효율적인, 그리고 경제적인 방법의 생산을 통한 그 산업적 이용인 경우가 많아서, 보다 안정적인 유전자 발현과 비용절감 등의 산업적 이용가치가 뛰어난 유전자 발현시스템을 개발할 필요성이 끊임없이 대두되며, 그를 위한 노력이 계속되고 있다.

<25> 이에, 본 발명자들은 목적단백질을 발현시키기 위하여 간단한 티벡터 클로닝만으로 목적 단백질의 고발현이 가능한 최종 발현벡터를 구축하고자 노력한 결과, 항시적 고발현 티벡터를 제작하고 PCR로 증폭된 목적 단백질의 유전자를 상기 벡터에 한번만 클로닝하여도 고발현이 가능하다는 것을 확인함과 아울러, 이를 이용해 미생물 유전체의 전체 발현 시스템 구축과 같은 대량의 목적 유전자들의 대량 발현에 매우 효율적으로 사용이 가능하다는 것을 확인하고, 본 발명을 완성하게 되었다.

【발명이 이루고자 하는 기술적 과제】

<26> 본 발명의 목적은 간단하고 신속하게 목적단백질의 유전자를 발현시키는 벡터 제작에 유용한 티벡터와 발현벡터로의 기능을 동시에 가지는 플라스미드 및 그 제조방법을 제공하는데 있다.

<27> 본 발명의 또 다른 목적은 상기 플라스미드에 목적유전자가 삽입되어 있는 발현벡터 및 상기 발현벡터로 형질전환된 박테리아를 제공하는데 있다.

- 28> 본 발명의 또 다른 목적은 상기 형질전환된 미생물을 배양하는 것을 특징으로 하는 목적 유전자의 발현방법을 제공하는데 있다.
- 29> 본 발명의 또 다른 목적은 동시에 다량의 목적유전자들을 효율적이고 경제적으로 발현하는 벡터 라이브러리 시스템을 제공하는데 있다.

【발명의 구성 및 작용】

- 30> 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 숙주세포에 제한을 받지 않고 항시적으로 고발현되는 벡터의 프로모터 하류에 티벡터 클로닝이 가능한 제한효소 인식부위를 2개 도입하여 티벡터와 발현벡터로의 기능을 동시에 가지며, 한 단계의 티벡터 클로닝만으로도 목적유전자의 발현 확인이 가능한 것을 특징으로 하는 플라스미드를 제공한다.
- 31> 상기 티벡터 클로닝이 가능한 제한효소 인식부위는 *Hph*I, *Mbo*II, *Asp*EI 및 *Xcm*I으로 구성된 군에서 선택된 어느 하나인 것이 바람직하고, 상기 2개의 제한효소 인식부위 사이에 폴리뉴클레오티드가 삽입되어 있는 것을 특징으로 할 수 있다.
- 32> 본 발명에 따른 플라스미드는 상기 제한효소로 절단할 경우, 상기 삽입된 폴리뉴클레오티드가 제거 위치의 양쪽 3'-말단에 티민 염기를 가진 뉴클레오티드가 노출되어 티벡터의 기능을 가지게 된다.
- 33> 본 발명의 바람직한 구현예에 있어서, 상기 항시적으로 고발현되는 벡터는 pHCE인 것을 특징으로 하며, pHCE의 HCE 프로모터 하류에 두개의 *Asp*EI 제한효소 인식부위가 도입되어 있고, 상기 두개의 *Asp*EI 제한효소 인식부위 사이에, 양쪽 말단에 *Asp*EI 제한효소 인식부위를 가지

는 폴리뉴클레오티드가 삽입되어 있는 것을 특징으로 하는 티벡터와 발현벡터로의 기능을 동시에 가지는 플라스미드(pHCE-FOREX)를 제공한다.

4> 본 발명은 또한, (a) pHCE 벡터 내의 *Asp*Ⅰ 제한효소 인식부위에 점돌연 변이를 유발시켜, 상기 제한효소 인식부위가 제거된 pHCE-M1을 제작하는 단계; (b) *Asp*Ⅰ 제한효소 인식부위를 포함하는 프라이머를 이용한 PCR을 통해 두 개의 *Asp*Ⅰ 제한효소 인식부위를 항시적 고발현 벡터(pHCE)의 HCE 프로모터 하류에 도입하여 pHCE-M2를 제작하는 단계; 및 (c) 상기 두 개의 *Asp*Ⅰ 제한효소 인식부위 사이에, 양쪽 말단에 *Asp*Ⅰ 제한효소 인식부위를 가지는 폴리뉴클레오티드를 삽입하여 티벡터와 발현벡터로의 기능을 동시에 가지는 플라스미드(pHCE-FOREX)를 제작하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 티벡터와 발현벡터로의 기능을 동시에 가지는 플라스미드(pHCE-FOREX)의 제조방법을 제공한다.

35> 본 발명은 또한, 상기 플라스미드를 상기 제한효소로 절단하여 상기 삽입된 폴리뉴클레오티드를 제거하고, 상기 폴리뉴클레오티드가 제거된 위치에 목적단백질을 암호화하는 유전자가 삽입되어 있는 것을 특징으로 하는 발현벡터를 제공한다.

36> 상기 목적단백질을 암호화하는 유전자는 PCR로 증폭한 것임을 특징으로 할 수 있다. 또한 상기 유전자는 아미노 말단이 ATG인 프라이머와 상기 유전자의 염기서열에 특이적인 프라이머를 사용하여 증폭한 PCR 산물인 것을 특징으로 할 수 있고, 상기 유전자 삽입부위에 *Nde*Ⅰ 제한효소 인식부위가 형성되어 있는 것을 특징으로 할 수 있다.

37> 본 발명은 또한, 상기 발현벡터로 형질전환된 박테리아 및 상기 형질전환된 박테리아를 배양하는 것을 특징으로 하는 목적단백질의 발현방법을 제공한다.

- 38> 본 발명은 또한, 상기 플라스미드에 다양한 유전자들의 라이브러리가 삽입된 발현벡터 라이브러리를 제공한다.
- 39> 본 발명은 또한, (a) 상기 발현벡터 라이브러리로 박테리아를 형질전환하는 단계; 및 (b) 상기 형질전환된 박테리아를 배양하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 목적 유전자의 클로닝 확인방법을 제공한다.
- 40> 상기 목적 유전자의 클로닝 확인방법은 상기 (b) 단계 이후에 플라스미드를 분리하고, 상기 플라스미드를 *NdeI* 제한효소로 절단하는 단계를 더 포함하는 것이 바람직하다.
- 41> 이하, 본 발명의 고발현 티벡터(pHCE-FOREX-T)의 제조방법과 이를 이용한 발현방법을 단계별로 나누어 보다 구체적으로 설명하고자 한다.
- 42> 제1단계: 두개의 *AspEI* 제한효소 인식부위가 첨가된 pHCE-M1의 제조
- 43> 항시적 고발현 프로모터와 서브클로닝에 유용한 멀티 클로닝 사이트를 가지고 있는 항시적 고발현 벡터(pHCE DNA vector: FERM P-17814)를 기본 골격으로 하여 티벡터를 제조하고자, 상기 pHCE 벡터에 존재하는 *AspEI* 제한효소 인식부위에 점돌연 변이를 유발시켜, 상기 제한효소 인식부위가 제거된 pHCE-M1을 제조하였다.
- 44> 두개의 *AspEI* 제한효소 인식부위를 포함하는 프라이머를 이용한 PCR을 통해 상기 pHCE-M1의 HCE 프로모터 하류(downstream)에 두개의 *AspEI* 제한효소 인식부위가 도입된 pHCE-M2를 제조하였다.

- > 제2단계: 항시적 고발현 티벡터용 플라스미드(pHCE-FOREX)의 제조
- > *Asp*EI 제한효소 인식부위를 함유하는 프라이머를 이용한 PCR을 통해 양쪽 말단에 *Asp*EI 제한효소를 가지는 약 800 bp의 폴리뉴클레오티드를 얻고, 이를 pHCE-M1의 *Asp*EI 제한효소 인식부위에 삽입하여 항시적 고발현 티벡터용 플라스미드 (pHCE-FOREX)를 제조하였다. 이는 추후 티벡터로의 전환 시 DNA 단편 분리를 용이하게 하기 위한 것이다.
- 7> 제3단계: 항시적 고발현 티벡터용 플라스미드(pHCE-FOREX)의 항시적 고발현 티벡터 (pHCE-FOREX-T)로의 전환
- 18> 항시적 고발현 티벡터용 플라스미드(pHCE-FOREX)로 형질전환된 대장균으로부터 플라스미드를 분리하여, 통상적인 반응 방법을 이용하여 플라스미드를 *Asp*EI 제한효소로 절단하고, 이를 아가로스 겔에 전기영동으로 전개시킨 다음 약 800 bp의 폴리뉴클레오티드가 분리되고 남은, 유전자의 양끝 3'-말단에 티민 염기를 가진 뉴클레오티드 하나씩을 포함하는 약 3000 bp의 항시적 고발현 티벡터(pHCE-FOREX-T)를 얻는다.
- 49> 제4단계: 목적 단백질을 암호화하는 유전자의 클로닝 및 고발현
- 50> 목적단백질을 암호화하는 유전자를 특이적인 프라이머를 사용한 PCR을 통해 증폭시키고, 준비된 항시적 고발현 티벡터(pHCE-FOREX-T)에 DNA 연결효소(ligase)를 사용해 클로닝한다. 목적단백질을 암호화하는 유전자 증폭용 아미노 말단 프라이머의 경우, 그 시작을 ATG로 해서 만들면 티벡터 클로닝 후 정방향의 삽입이 이루어졌을 경우, *Nde*I 제한효소 인식부위가 생성되어 쉽게 클로닝의 성공여부를 확인할 수 있도록 티벡터가 설계되어 있다.

- 1> 이렇게 정방향으로 발현시키고자 하는 유전자가 삽입된 경우, 이 플라스미드를 가진 형질전환된 대장균을 배양하여 발현 유도물질 처리 없이 일정 시간 후에 목적단백질의 과발현을 확인할 수 있다.
- 32> 본 발명의 고발현 티벡터용 플라스미드는, 티벡터용 플라스미드에 의하여 형질전환된 대장균으로부터 플라스미드를 분리하고, 이를 *Asp*DI 제한효소로 절단한 다음, 약 800 bp의 폴리뉴클레오티드 부분을 제외한 나머지 플라스미드 부분을 순수분리 정제함으로써, 용이하게 고발현 티벡터로 전환시킬 수 있으며 대장균 내에 형질전환된 상태로 플라스미드 보관이 가능한 우수한 저장성을 가진다. 또한 발현을 원하는 목적 단백질을 암호화하는 유전자를 한 번 클로닝으로 바로 발현의 확인까지도 가능하며, 이는 숙주 대장균의 종류에 관계없이 가능한 시스템으로서의 장점까지 내포한다.
- 53> 또한, 본 발명에 따른 플라스미드 시스템은, 대량의 목적유전자를 동시에 발현하는 시스템의 구축시에, 기존의 다른 시스템과 비교하여, 월등한 효율성을 보인다. 이는 본 발명의 플라스미드 시스템만이 가질 수 있는 장점으로 티벡터 클로닝하여 만들어지는 발현용 플라스미드가 사용하는 프로모터가 항시적 고발현 프로모터이며, 숙주 세포의 제한을 받지 않고 모든 대장균에서 발현이 가능한 특징으로 인해 한번의 클로닝으로 얻어진 형질전환체로부터 바로 발현의 확인이 가능하다. 이러한 장점으로 인해, 미생물 유전체 발현 시스템 구축 등의 효율을 획기적으로 개선하는 것이 가능하다.

- 4> 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세하게 설명하기로 한다. 이들 실시예는 단지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 국한되지 않는다는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 자명할 것이다.
- 5> 특히, 하기 실시예에서는 항시적 발현벡터로 pHCE를 사용하였으나, 숙주세포에 제한을 받지 않고 발현되는 벡터라면 제한 없이 사용할 수 있다.
- 36> 또한 하기 실시예에서는 pHCE의 HCE 프로모터 하류에 두개의 *Asp*Ⅰ 인식부위를 도입하였으나, *Hph*Ⅰ, *Mbo*Ⅱ, *Xcm*Ⅰ 등 제한효소로 절단할 경우, 양쪽 3'-말단에 티민 염기를 가진 뉴클레오타이드를 노출시키는 제한효소 인식부위를 도입하여도 동일한 결과를 얻을 수 있다는 것은 당업자에게 자명한 사실이라 할 것이다. 다만, 사용하는 모 항시적 발현벡터에 상기 제한효소의 인식부위가 존재할 경우에는 그 부위를 돌연변이시켜 제거하여야 한다.
- 57> 실시예 1 : 항시적 고발현 티벡터용 플라스미드의 제조
- 58> 기존 pCHE 벡터에 존재하는 *Asp*Ⅰ 제한효소 인식부위를 제거하기 위하여, 하기 서열 1의 프라이머를 이용한 PCR을 통해 *Asp*Ⅰ 제한효소 인식부위에 점돌연 변이를 유발시켜, 상기 제한효소 인식부위가 제거된 pHCE-M1을 제조하였다.
- 59> 서열 1: 5'-GCCTGGCTCCCCGTTGTGTAGATAAC-3'
- 60> 상기 PCR은 50 μ l 당 10 mM 트리스 염화수소(pH 9.0), 1.5 mM 염화마그네슘, 50 mM 염화칼륨, 0.1% 트리톤 X-100, 및 150 μ M의 4 종류의 디옥시뉴클레오타이드 트리포스페이트(dATP, dTTP, dGTP, dCTP)를 포함하는 시약조성에, 50 ng의 항시적 고발현 벡터(pHCE DNA vector)를 주형으로 하여 10 pmol의 상기 서열 1의 프라이머와 2 unit의 ExTaq DNA 중합효소 (TaKaRa,

Japan)를 첨가한 다음, 중합효소연쇄반응기(iCycler, BIO-RAD, USA)에서 94℃ 30초, 50℃에서 30초, 72℃에서 3분을 1사이클의 온도변화로 하는 30회의 사이클을 수행하였다.

<61> 다음으로, pHCE-M1에 *Asp*EI 제한효소 인식부위를 생성하기 위하여 *Asp*EI 제한효소 인식부위 (5'-GACNN↓NNGTC-3')를 포함하는 하기 서열 2 및 3의 프라이머를 이용한 PCR을 통해 pHCE-M1의 HCE 프로모터 하류(downstream)에 두 개의 *Asp*EI 제한효소 인식부위가 도입된 pHCE-M2를 제조하였다. 하기 서열 2 및 3의 프라이머 염기서열은 *Asp*EI 제한효소 인식부위는 밑줄로 표시된 부분이다.

<62> 서열 2: 5'-TCCGACATATGGTCATCTCCTTCGGTATATCTCCTTTTCCAG-3'

<63> 서열 3: 5'-GGACTTAAGGTCGGATCATTAGTCCGCGTGGC-3'

<64> 상기 PCR시와 같이 pHCE-M1을 주형으로 하여 10 pmol의 상기 서열 2 및 3의 프라이머와 2 unit의 ExTaq DNA 중합효소 (TaKaRa, Japan)를 첨가한 다음, 중합효소연쇄반응기(iCycler, BIO-RAD, USA)에서 94℃ 30초, 50℃에서 30초, 72℃에서 3분을 1사이클의 온도변화로 하는 30회의 사이클을 수행하였다.

<65> 이렇게 하여 얻어진 플라스미드 pHCE-M2를 티벡터로 전환하는 경우, DNA 분리를 용이하게 하기 위하여, 상기 두개의 *Asp*EI 제한효소 인식부위 사이에, 양쪽 말단에 *Asp*EI 제한효소 인식부위를 가지는 800 bp의 DNA 증폭산물을 삽입하여 플라스미드 (pHCE-FOREX)를 제조하였다. 상기 800 bp의 DNA 증폭산물은 *Asp*EI 제한효소 인식부위를 함유하는 하기 서열 3 및 4의 프라이머를 이용한 PCR을 통하여 수득하였다. 이 PCR 역시 앞서 수행하였던 것과 동일한 조건의 시약조성을 이용하였고, 중합효소연쇄반응기(iCycler, BIO-RAD, USA)에서 94℃ 30초, 50℃에서 30초, 72℃에서 1분을 1사이클의 온도 변화로 하는 30회의 사이클로 수행하였다.

<66> 서열 4: 5'-GACCATATGTCGAAAGTTTATATTAGTGCAG-3'

<67> 서열 5: 5'-GACCTTAAGTCCAGTTAAAACTGCAATATTCG-3'

<68> 이렇게 하여 만들어진 항시적 고발현 티벡터용 플라스미드 pHCE-FOREX는 티벡터로서의 기능뿐만 아니라 발현벡터로서의 기능을 가지고 있다.

<69> 실시예 2 : 티벡터용 플라스미드의 티벡터로의 전환

<70> 실시예 1에서 수득된 *Asp*FI 제한효소 인식부위를 말단에 포함하고 길이 800 bp인 DNA 단편이 클로닝된 항시적 고발현 티벡터용 플라스미드(pHCE-FOREX)를 티벡터로 전환하기 위하여, 고순도로 분리 및 정제한 티벡터용 플라스미드를 3 μ g DNA 당 10unit의 *Asp*FI 제한효소로 37°C에서 6시간 동안 처리한 다음 1% 아가로스 젤 상에 전기영동하였다(도 2).

<71> 도 2에서, 제1레인은 1 kb plus DNA ladder(Promega Co. USA); 제2레인은 고발현 티벡터용 플라스미드(pHCE-FOREX)를 *Asp*FI(2회 절단)로 처리하였을 때 잘려진 티벡터와 잘려져 나온 유전자의 위치를 나타낸다. 도 2에서 볼 수 있듯이, pHCE-FOREX 티벡터용 플라스미드가 *Asp*FI 제한효소에 의해 두 번 절단되었을 경우, 아가로스 젤 상에서의 이동거리가 잘려진 폴리뉴클레오타이드 간에 서로 상당히 달라, 티벡터용 DNA 단편을 쉽게 분리할 수 있다는 것을 확인하였다. *Asp*FI으로 처리하였을 때 잘려진 약 3000 bp의 티벡터 DNA 단편을 젤 정제키트(Bioneer, Korea)를 사용하여 정제한 다음, 티벡터(pHCE-FOREX-T)로 사용하였다. 도 1은 신규 항시적 고발현 티벡터인 (pHCE-FOREX-T)의 구조 및 구성에 대한 개략도이다.

<72> 실시예 3 : pHCE-FOREX로부터 전환된 티벡터를 이용한 클로닝

- <73> 항시적 고발현 티벡터용 플라스미드(pHCE-FOREX)에 제한효소 *Asp*EI을 처리하여 전환된 티벡터의 클로닝 효율을 검증하기 위하여, hTNF- α (human tumor necrosis factor- α) 유전자를 PCR로 증폭한 다음, 티벡터에 연결하여 클로닝하였다.
- <74> 우선, hTNF- α 유전자의 증폭을 위해 유전자의 염기서열에 ATG가 삽입된 서열 6의 프라이머와 염기서열 특이적인 서열 7의 프라이머를 디자인하였다.
- <75> 서열 6: 5'-ATGGTCAGATCATCTTCTC-3'
- <76> 서열 7: 5'-CAGGGCAATGATCCAAAG-3'
- <77> 유전자 증폭을 위하여, 50 μ l 당 10 mM 트리스 염화수소(pH 9.0), 1.5 mM 염화마그네슘, 50 mM 염화칼륨, 0.1% 트리톤 X-100, 및 150 μ M의 4 종류의 디옥시뉴클레오타이드 트리포스페이트(dATP, dTTP, dGTP, dCTP)를 포함하는 시약조성에, 10 pmol의 상기 서열 6 및 7의 프라이머와 2 unit의 ExTaq DNA 중합효소 (TaKaRa, Japan)를 첨가한 다음, 중합효소연쇄반응기 (iCycler, BIO-RAD, USA)에서 94 $^{\circ}$ C 30초, 52 $^{\circ}$ C에서 30초, 72 $^{\circ}$ C에서 40초를 단위 온도 변화로 하는 30회의 사이클로 PCR을 수행하였다.
- <78> 유전자 증폭산물을 1% 아가로스 겔에서 전기영동하여 확인한 후, 겔 정제키트(Bioneer, Korea)를 사용하여 정제하였다 (도 3). 도 3에서, 제1레인은 1 kb plus DNA ladder(Promega Co. U.S.A.); 제2레인은 472 bp 크기의 정제된 hTNF- α 유전자 증폭산물이다. 실시예 2에서 준비된 50 ng의 티벡터와 증폭 정제된 hTNF- α 유전자 증폭산물을 5 unit의 T4 DNA 연결효소 (TaKaRa, Japan)로 연결하여 대장균 JM109에 형질전환 하였다. 형질전환된 대장균을 5 ml LB배지에서 배양한 다음 플라스미드를 분리하고, hTNF- α 의 클로닝 여부를 확인하였다.

▷ 얻어진 형질전환체 중에서 무작위적으로 선별된 12개의 콜로니를 확인해 본 결과, 모두 hTNF- α 가 삽입된 매우 높은 클로닝 효율을 보였다. ATG로 시작하는 프라이머를 이용한 유전자 증폭 산물을 클로닝할 경우, HCE 프로모터에 정방향으로 삽입되면 *NdeI* 제한효소 인식부위가 생성되는 것을 이용해 *NdeI* 제한효소 절단을 통해 클로닝 방향을 확인해 본 결과, hTNF- α 가 삽입된 12개의 콜로니 중에서 6개가 HCE 프로모터에 정방향으로 클로닝되어 있음을 확인하였다 (도 4).

30> 도 4에서, 제1레인과 9레인은 1 kb plus DNA ladder(Promega Co. USA); 제2레인은 DNA 크기비교를 위한 대조군으로 한 곳만의 인식부위를 가진 *EcoRI*으로 pHCE-FOREX를 절단한 것; 제3레인 내지 제8레인 및 제10레인 내지 제14레인은 상기한 12개의 콜로니로부터 얻은 DNA를 *NdeI* 제한효소로 절단한 후 전개한 것이다. 제 5, 7, 8, 12, 13 및 14레인에 전개된 6개의 경우 *NdeI*에 의하여 절단되어 약 3.5 kb의 단일 DNA 단편이 관찰되며, 이로부터 이들 6개의 콜로니가 hTNF- α 가 정방향으로 티벡터에 클로닝되어 있음을 확인하였다.

<81> 실시예 4 : 클로닝된 유전자 증폭산물로부터 발현되는 단백질의 확인

<82> *NdeI* 제한효소 처리를 통해 확인된 6개의 콜로니들은 hTNF- α 를 코딩하는 유전자가 HCE 프로모터에 정방향으로 삽입되었으므로, 본 티벡터가 가지는 발현벡터로서의 특성을 이용해 재 클로닝 과정이나 다른 숙주세포로의 형질전환 없이 바로 hTNF- α 의 발현을 확인해 볼 수 있다

- 33> 상기 클로닝 확인 콜로니 12개를 LB 배지에서 20시간 배양한 후, 각 배양세포로부터 얻은 단백질을 10 μ g 씩을 12% SDS-폴리아크릴아마이드 겔 (SDS-PAGE)을 통해 분리하고, 염색약 (Brilliant Blue R250)으로 단백질을 염색하여 hTNF- α 발현여부를 확인하였다(도 5).
- 34> 결과적으로 고발현 된 hTNF- α 로 예상되는 밴드가 제 4, 6, 7, 12 및 13레인에서 확인되었으며, HCE 프로모터에 정방향으로 유전자가 삽입된 콜로니 6개중 5개에서 고발현이 성공되었음을 알 수 있다. 도 5에서, 제1레인과 8레인은 저분자량 마커(Amersham, USA)이며, 제2레인 내지 제7레인 및 제9레인 내지 제14레인은 앞서 얻어진 12개의 형질전환체를 배양하여 얻은 단백질 10 μ g씩을 전개한 것이다. 여기서 전개된 실험군의 전개순서는 앞서 클로닝을 확인했던 콜로니 12개의 전개 나열순서와 동일하게 하였다.

【발명의 효과】

- <85> 이상에서 구체적으로 설명하고 증명하였듯이, 본 발명에 따른 티벡터와 발현벡터로의 기능을 동시에 가지는 플라스미드는 티벡터로의 전환이 용이하고, 한번의 클로닝 단계를 거쳐 그 목적단백질의 발현까지 확인하는 것이 가능하다. 특히, *Asp*DI 제한효소 인식 사이트 간의 간격이 약 800 bp 떨어져 있어서, 제한효소 절단 시 절단된 벡터의 구별이 용이하고, 플라스미드 형태이므로 우수한 저장성을 가진다.
- <86> 또한 본 발명의 발현벡터는 클로닝 한 번 만으로 재 서브클로닝의 필요 없이 발현을 확인할 수 있는 매우 효율적인 특성을 가지고 있으므로 발현하고자 하는 목적 단백질을 암호화하는 유전자의 클로닝에 널리 활용될 수 있다. 특히, 대량의 목적 유전자들에 대한 발현 플라스미드의 동시 제조가 가능하여, 단시간에 특정 미생물 유전체의 발현시스템 구축 및 특정 유전

자균의 발현시스템 구축에의 응용이 가능하다. 또한, 항시적 고발현 시스템의 발현벡터이므로 발현 유도물질의 처리가 필요 없고, 특이적인 숙주 대장균을 필요로 하지 않는 매우 유용한 발현 시스템과 결합되어 있는 벡터로 그 유용성이 매우 높다.

【특허청구범위】**【청구항 1】**

숙주세포에 제한을 받지 않고 항시적으로 고발현되는 벡터의 프로모터 하류에 티벡터 클로닝이 가능한 제한효소 인식부위를 2개 도입하여 티벡터와 발현벡터로의 기능을 동시에 가지며, 한 단계의 티벡터 클로닝만으로도 목적유전자의 발현 확인이 가능한 것을 특징으로 하는 플라스미드.

【청구항 2】

제1항에 있어서, 티벡터 클로닝이 가능한 제한효소 인식부위는 *Hph*I, *Mbo*II, *Asp*FI 및 *Xcm*I으로 구성된 군에서 선택된 어느 하나이고, 상기 2개의 제한효소 인식부위 사이에 폴리뉴클레오티드가 삽입되어 있는 것을 특징으로 하는 플라스미드.

【청구항 3】

제2항에 있어서, 상기 플라스미드를 상기 제한효소로 절단할 경우, 상기 삽입된 폴리뉴클레오티드가 제거 위치의 양쪽 3'-말단에 티민 염기를 가진 뉴클레오티드가 노출되는 것을 특징으로 플라스미드.

【청구항 4】

제1항에 있어서, 항시적으로 고발현되는 벡터는 pHCE인 것을 특징으로 하는 플라스미드.

【청구항 5】

제4항에 있어서, pHCE의 HCE 프로모터 하류에 두개의 *Asp*Ⅺ 제한효소 인식부위가 도입되어 있고, 상기 두개의 *Asp*Ⅺ 제한효소 인식부위 사이에, 양쪽 말단에 *Asp*Ⅺ 제한효소 인식부위를 가지는 폴리뉴클레오티드가 삽입되어 있는 것을 특징으로 하는 티벡터와 발현벡터로의 기능을 동시에 가지는 플라스미드(pHCE-FOREX).

【청구항 6】

하기의 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 티벡터와 발현벡터로의 기능을 동시에 가지는 플라스미드(pHCE-FOREX)의 제조방법:

(a) pHCE 벡터 내의 *Asp*Ⅺ 제한효소 인식부위에 점돌연 변이를 유발시켜, 상기 제한효소 인식부위가 제거된 pHCE-M1을 제작하는 단계;

(b) *Asp*Ⅺ 제한효소 인식부위를 포함하는 프라이머를 이용한 PCR을 통해 두 개의 *Asp*Ⅺ 제한효소 인식부위를 항시적 고발현 벡터(pHCE)의 HCE 프로모터 하류에 도입하여 pHCE-M2를 제작하는 단계; 및

(c) 상기 두 개의 *Asp*Ⅺ 제한효소 인식부위 사이에, 양쪽 말단에 *Asp*Ⅺ 제한효소 인식부위를 가지는 폴리뉴클레오티드를 삽입하여 티벡터와 발현벡터로의 기능을 동시에 가지는 플라

스미드(pHCE-FOREX)를 제작하는 단계.

【청구항 7】

제2항의 플라스미드를 상기 제한효소로 절단하여 상기 삽입된 폴리뉴클레오티드를 제거한 다음, 상기 폴리뉴클레오티드가 제거된 위치에 목적단백질을 암호화하는 유전자를 삽입하여 얻어지는 발현벡터.

【청구항 8】

제7항에 있어서, 상기 유전자는 PCR로 증폭한 것임을 특징으로 하는 발현벡터.

【청구항 9】

제8항에 있어서, 상기 유전자는 아미노 말단이 ATG인 프라이머와 상기 유전자의 염기서열에 특이적인 프라이머를 사용하여 증폭한 PCR 산물인 것을 특징으로 하는 발현벡터.

【청구항 10】

제7항에 있어서, 상기 유전자 삽입부위에 *NdeI* 제한효소 인식부위가 형성되는 것을 특징으로 하는 발현벡터.

【청구항 11】

제7항 내지 제10항 중 어느 한 항의 발현벡터로 형질전환된 박테리아.

【청구항 12】

제11항의 형질전환된 박테리아를 배양하는 것을 특징으로 하는 목적단백질을 암호화하는 유전자의 발현방법.

【청구항 13】

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항의 플라스미드에 다양한 유전자 라이브러리가 삽입되어 있는 것을 특징으로 하는 발현벡터 라이브러리.

【청구항 14】

(a) 제13항의 발현벡터 라이브러리로 박테리아를 형질전환하는 단계; 및

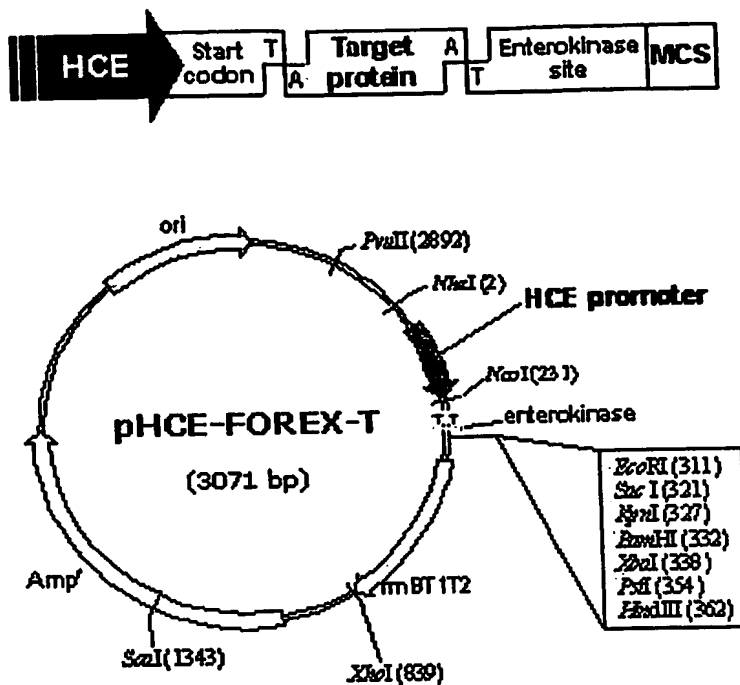
(b) 상기 형질전환된 박테리아를 배양하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 목적 유전자의 클로닝 확인방법.

【청구항 15】

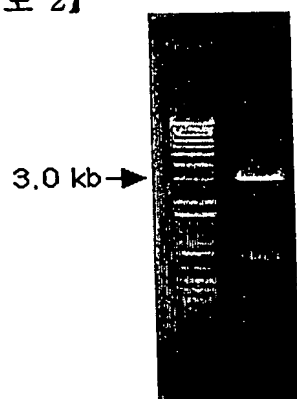
제14항에 있어서, 상기 (b)단계 이후에 플라스미드를 분리하고, 상기 플라스미드를 *NdeI* 제한효소로 절단하는 단계를 더 포함하는 것을 특징으로 하는 목적 유전자의 클로닝 확인방법.

【도면】

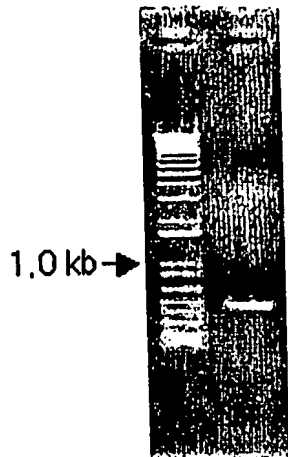
【도 1】



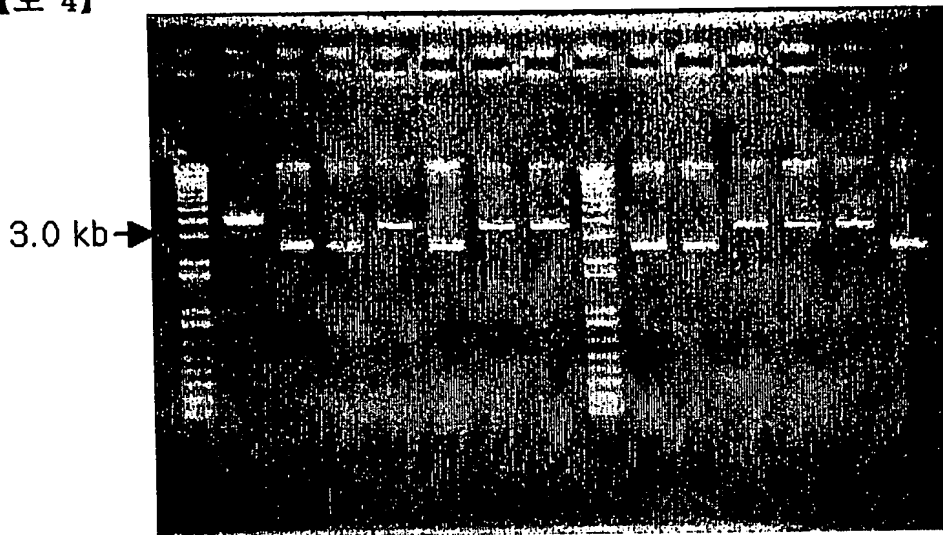
【도 2】



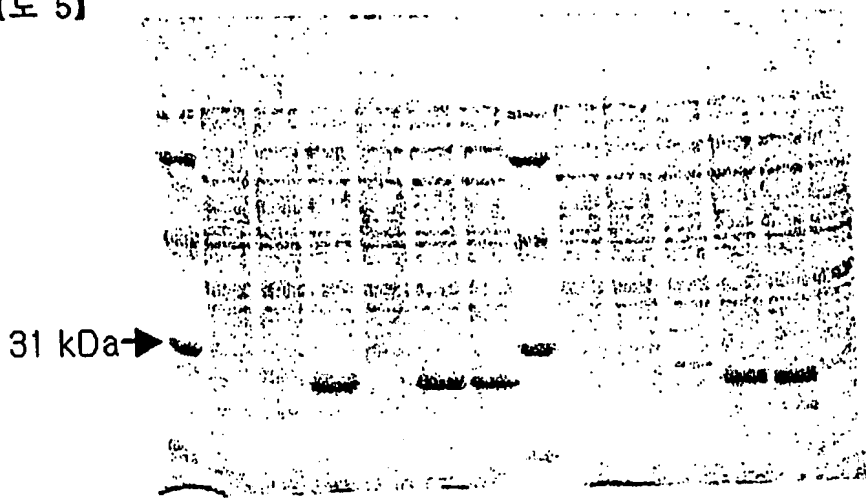
【도 3】



【도 4】



【도 5】



【서열목록】

<110> BIOLEADERS <120> Plasmid having a function of T-vector and expression
vector, and expression of the target gene using the same <130> P03-114 <
160> 7 <170> KopatentIn 1.71 <210> 1 <211> 26 <212> DNA <213>
Artificial Sequence <220> <223> PCR primer for deleting AspEI site in pCHE vector
<400> 1 gcctggctcc ccgttgtgta gataac
26 <210> 2 <211> 43 <212> DNA <213> Artificial Sequence <220> <223>
PCR primer containg AspEI site <400> 2 tccgacatat ggatcatctcc ttcggtatat ctccttttt
cag 43 <210> 3 <211> 33 <212> DNA <213>
Artificial Sequence <220> <223> PCR primer containing AspEI site <400> 3
ggacttaagg tcggatcatt agttccgcgt ggc 33 <210>
4 <211> 31 <212> DNA <213> Artificial Sequence <220> <223> PCR primer
for 800 bp polynucleotide <400> 4 gaccatatgt cgaaagttta tattagtgc g
31 <210> 5 <211> 33 <212> DNA <213> Artificial Sequence <220> <223>

PCR primer for 800bp polynucleotide <400> 5 gaccttaagt ccagttaaaa actgcaatat tcg

33 <210> 6 <211> 19 <212> DNA <213> Artificial Sequence <220> <223>

PCR primer containg ATG sequence <400> 6 atggtcagat catcttctc

19 <210> 7 <211> 18 <212> DNA <213> Artificial Sequence <220> <223>

PCR primer containg ATG sequence <400> 7 cagggaatg atccaaag